

10/50/697 #2
PCT/CU/3/00002

REC'D PCT/PTO 16 JUL 2004



REPÚBLICA DE CUBA

REC'D 19 FEB 2003

WIPO. PCT



Ing. María de los Angeles Sánchez Torres, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CERTIFICO: Que bajo el número veinte del año dos mil dos del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención, por **METODO PARA LA ESTIMULACION DEL CRECIMIENTO Y RESISTENCIA A ENFERMEDADES EN ORGANISMOS ACUATICOS**, con fecha veinticuatro de enero de dos mil dos, a las once horas y cincuenta y dos minutos ante meridiano, por Raimundo Ubieta Gómez, Representante, ciudadano cubano, a nombre y en representación del **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA**, cuya invención fue creada por Mario Pablo Estrada García; Rebeca Martínez Rodríguez; Amilcar Arenal Cruz; Rafael Marcos Pimentel Pérez; Antonio Morales Rojas; Eulogio Pimentel Vázquez; Alexander Espinosa Vázquez; Carmen Aday García Molina; Edenaida Cabrera González; Mirta Vinjoy Campa; Sergio Toledo Pérez; Olimpia Carrillo Farnés y Claudina Zaldívar Muñoz.

ASIMISMO CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIÉN CERTIFICO: Que la Memoria Descriptiva, las Reivindicaciones y los Dibujos son iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Mariela Vázquez Castillo, Agente Oficial, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los ocho días del mes de enero de dos mil tres.

Ing. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora General

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

MEMORIA DESCRIPTIVA

Método para la estimulación del crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos.

La invención está relacionada con la aplicación de la síntesis química para incrementar la eficiencia del crecimiento de peces y crustáceos de valor comercial. La síntesis de péptidos análogos del tipo Leu-encefalina y Met-encefalina ha sido reportada y se ha demostrado su capacidad de estimular la liberación de la hormona de crecimiento en mamíferos y aves (Bowers C, Momany, G, Reynolds G and A. Hong. 1984. *Endocrinology* . 114: 1537-45).

Estudios para entender la relación estructura-actividad de péptidos liberadores de la hormona de crecimiento han sido desarrollados en mamíferos y aves, identificándose que el hexámero GHRP-6 ($\text{His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH}_2$), es extremadamente potente y seguro para provocar la liberación de la hormona de crecimiento, incluso en el hombre (Bowers C, Momany, G, Reynolds G and A. Hong. 1984. *Endocrinology* . 114: 1537-45), sin embargo no existen reportes previos del uso de este compuesto en organismos acuáticos.

Teniendo en cuenta que no existen evidencias en crustáceos, hasta el presente, de que exista una cascada de señales que intervienen en la estimulación del crecimiento (hipotálamo-hipófisis-órgano blanco), se muestra por primera vez, que el péptido GHRP-6, por si solo es capaz de ejercer una función biológica similar en crustáceos.

La acuicultura es dominada por la producción de peces de agua dulce; sin embargo desde la pasada década se ha incrementado el aporte de algas marinas, moluscos y crustáceos a la producción global de la acuicultura. Una mejor comprensión de la genética, reproducción, nutrición y fisiología del organismo seleccionado es el primer paso para contribuir en su desarrollo productivo (Gómez-Chiarri M, Smith GJ, de la Fuente J and Powers DA. 1998. In de la Fuente J and Castro FO, editors. *Gene transfer in aquatic organisms*. Austin, Texas: RG Landes Company and Germany: Springer Verlag; p.107-125).

El conocimiento de las características moleculares de las hormonas con influencia en el crecimiento de especies marinas de importancia económica puede ser utilizado para alcanzar un mejor comportamiento productivo de estas especies en cultivo.

Como ejemplo de lo anteriormente expresado se puede mencionar el uso de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) y un antagonista del receptor de la dopamina utilizado por Silverstein y colaboradores en 1999 (Silverstein JT., Bosworth BG. and

Wolters WR. 1999. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 30, No.2, June, 263 – 268), para regular e inducir la reproducción en pez gato (*Ictalurus punctatus*), especie de gran importancia económica en la acuicultura mundial.

Otro resultado interesante de la utilización de péptidos sintéticos para el aumento de la productividad en animales de granja, fue lo reportado por Hashizume y colaboradores en 1997 (Hashizume T., Sasaki M., Tauchi S. and Masuda H. 1997. Animal Science and Technology. Vol. 68, No.3, March, 247-256) cuando demostraron la inducción de la hormona de crecimiento en cabras por la aplicación de inyecciones con un nuevo péptido sintético liberador de la hormona de crecimiento.

El suministro de hormonas como la insulina ha sido ensayada también en peces de forma oral demostrándose que produce cambios en señales de receptores y hormonas que intervienen en la adaptación de las carpas a diferentes temperatura (Vera MI., Romero F., Figueroa J., Amthauer R., Leon G., Villanueva. and Krauskopf M. 1993. Comp. Biochem. Physiol. Vol.106A, No.4, 677-682)

En mamíferos también se han estudiado otras variantes sintéticas de péptido liberador de hormona de crecimiento, como el reportado en 1995 por Patchett y colaboradores con el péptido MK-0677, designado como potente activador oral de la hormona de crecimiento en perros, sin provocar efectos en los niveles de tirosina y prolactina después de su aplicación (Patchett AA., Nargund RP., Tata JR., Chen MH., Barakat KJ., Johnston DBR., Cheng K., Chan WWS., Butler B., Hickey G., Jacks T., Schleim K., Pong SS., Chaung LYP., Chen HY., Frazier E., Leung KH., Chiu SHL. and Smith RG. 1995. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.92, 7001-7005)

También se han ensayado hormonas liberadoras de la hormona de crecimiento en vacas con fines de incremento de la producción de leche, ya que el aumento de los niveles circulantes de GH, estimula entre otras cosas la producción de leche (Soliman EB., Hashizume T., Ohashi S. and Kanematsu S. 1997. Domestic animal endocrinology. Vol.14(1), 39-46)

En peces no existen reportes anteriores de la utilización del péptido GHRP-6, por lo que su utilización para estimular crecimiento, aumentar sobrevida, aumentar la resistencia a agentes patógenos que se reportan en este documento constituyen una gran solución para la potenciación y aumento de la productividad del cultivo de organismos acuáticos.

Aunque se han dado pasos de avance en la domesticación y cruzamiento genético de algunas especies de camarones como son *Penaeus japonicus* y *Litopenaeus vannamei*, no ha existido un progreso suficiente, por la falta de comprensión de los procesos genéticos y bioquímicos de estas especies (Benzie, J.A.H., 1998. Penaeid genetics and

biotechnology. *Aquaculture* 164, 23–47; Fjalestadl, K.T., Carr, W.H., Lotz, J.L., Sweeney, J.N., 1999. *Aquaculture* 173, 10), por lo que una de las aplicaciones con mayor importancia en los camarones peneidos podría ser la ingeniería genética enfocada al mejoramiento del crecimiento y al aumento de su resistencia a agentes patógenos (Bachere, E., Mialhe, E., Noel, D., Boulo, V., Morvan, A., Rodriguez, J. (1995) *Aquaculture*.132, 17-32).

Se concierne en esta invención que el péptido GHRP-6 es capaz por si solo de estimular el crecimiento, mejorar la calidad de las larvas, aumentar las defensas contra agentes patógenos, aumentar el peso seco, concentración de proteínas y ARN en el músculo de peces, crustáceos y moluscos .

Ventajas de la solución propuesta

En la presente invención se presenta por primera vez la utilización del péptido GHRP-6 para la estimulación del crecimiento y la resistencia a agentes patógenos y otras enfermedades. Se demuestra además que el secretagogo GHRP-6 por si solo estimula el crecimiento en peces y crustáceos mediante la inyección, por la vía oral o por inmersión. Se demuestra además su efecto en la defensa contra agentes patógenos, el incremento del peso seco en el músculo de los organismos acuáticos tratados, el aumento de la concentración de proteínas y ARN en el tejido y el mantenimiento de los eritrocitos como demostración de su inocuidad en tilapia.

Breve Descripción de las Figuras

Figura 1. Niveles de GH en suero y de ARN mensajero de IGF-I en hígado de tilapias juveniles inyectadas con el secretagogo GHRP-6. Cada grupo de tres animales fue inyectado intraperitonealmente. Muestras de suero y hígado fueron tomadas a los 15, 30, 60 y 360 minutos después de la inyección. Muestras de suero fueron tomadas de cada animal antes de la inyección. * diferencia significativa sobre el grupo control ($p < 0.001$ ANOVA, Duncan test). tiGH: Hormona de crecimiento de tilapia. Las barras indican el error estándar.

Figura 2. Crecimiento neto y específico de las tilapias tratadas con el péptido GHRP-6 por vía intraperitoneal y un grupo control durante tres semanas. * t-test $p = 0.029$. Las barras indican la variación en el peso \pm el error estándar (ES) y los triángulos la velocidad específica de crecimiento de ambos grupos.

Figura 3. Crecimiento neto y específico de las tilapias tratadas con el péptido GHRP-6 por vía oral en solución acuosa y su grupo control. La duración del experimento fue de

tres semanas. * t-test $p = 0.015$. Las barras indican la variación en el peso ($\pm ES$) y los triángulos la velocidad específica de crecimiento de ambos grupos ($\pm ES$)

Figura 4. Crecimiento neto y específico de las tilapias tratadas con el péptido GHRP-6 encapsulado por vía oral y su grupo control. La duración del experimento fue de tres semanas. * t-test $p = 0.05$, ** t-test $p=0.007$. Las barras indican la variación en el peso ($\pm ES$) y los triángulos la velocidad específica de crecimiento de ambos grupos ($\pm ES$)

Figura 5. Experimento de crecimiento en camarones *Litopenaeus schmitti* tratados con el péptido GHRP-6. A: Perfil de aumento del peso en miligramos de los camarones en los tres grupos tratados con el péptido y el grupo control. B: Perfil de aumento del largo en milímetros de los camarones en los tres grupos tratados con el péptido y el grupo control. C: Distribución de la frecuencia absoluta de las ramificaciones branquiales de tres grupos tratados con el péptido y el grupo control. D: Distribución de la frecuencia absoluta de las modificaciones rostrales de tres grupos tratados con el péptido y el grupo control.

I, II, III: Grupos tratados con diferentes concentraciones de péptido.

Control Grpo tratado con BSA.

*** $p < 0.001$. Las barras indican la variación en el peso ($\pm DS$). ANOVA seguido por un DUNCAN en el caso de la talla y el peso. Kolmogorov-Smirnov en las ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales.

Figura. 6 Perfil del peso seco en animales tratados con el péptido y controles. *** t-test $p < 0.001$. Las barras indican la variación en el peso ($\pm DS$).

Figura. 7 Relaciones entre RNA, Proteína y DNA. Como se observa en la figura hay diferencias significativas lo que dice de la hipertrofia de estos parámetros en los animales tratados con péptido. *** t-test $p < 0.001$. Las barras indican la variación en el peso ($\pm DS$).

Figura 8. Crecimiento neto en condiciones de producción de camarones tratadas con baños de inmersión con el péptido GHRP-6 en su estadio larval y el grupo control con BSA. La duración del experimento fue de seis semanas. *** t-test $p < 0.001$. Las barras indican la variación en el peso ($\pm DS$).

Descripción detallada de la invención

Para demostrar la estimulación del crecimiento, en organismos acuáticos, más específicamente en peces, crustáceos y moluscos, empleando solamente el hexapéptido GHRP-6 "Growth hormone release peptide" de secuencia: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, primeramente se demostró que en peces era capaz de efectuar una actividad

biológica similar a la mostrada en mamíferos y aves (Bowers C, Momany, G, Reynolds G and A. Hong. 1984. Endocrinology . 114: 1537-45).

Para ello se suministraron inyecciones del péptido a tilapias juveniles y se obtuvieron muestras de suero e hígado de las mismas a diferentes tiempos, demostrándose como al igual que en mamíferos y aves, después de la inyección del péptido aumentan los niveles circulantes de la hormona de crecimiento en suero a los 15 minutos y media hora después se observó un aumento del ARN mensajero del IGF-I en hígado (Ejemplo 1).

Teniendo en cuenta que no existen evidencias hasta el presente, de que la cascada de las señales que intervienen en la estimulación del crecimiento, hipotálamo-hipófisis-órgano blanco (hígado), se conserve exactamente igual en los organismos acuáticos que en mamíferos y aves, se muestra por primera vez que el péptido GHRP-6 por si solo y administrado por diferentes vías es capaz de ejercer su actividad en peces.

Se realizaron experimentos de comparación del crecimiento en tilapias juveniles, administrándole a un grupo experimental el GHRP-6 y al grupo control se le administró solución salina en cada caso en dependencia de la vía de administración. Se utilizaron tres vías de administración: a) Inyección intraperitoneal; b) Oral; c) Inmersión.

En los tres casos se observó un incremento significativo del aumento del peso diario de las tilapias tratadas con el péptido GHRP-6 en comparación con su grupo control en cada caso. (Ejemplo 2)

Otro experimento de gran valor para demostrar el efecto del péptido GHRP-6 en peces fue demostrar su aplicabilidad en tilapias de 1 mg de peso por vía de la inmersión y estudiar el efecto que este provocaba en la defensa contra los patógenos y en la calidad de su músculo (Ejemplo 3)

Los resultados muestran que el grupo de tilapias tratadas con el péptido incrementó significativamente su peso, mostró menor índice de intensidad y extensión de la invasión de agentes patógenos que el grupo control y presentó menor contenido de agua en su músculo así como mayor concentración de proteínas lo que sugiere que el aumento de peso provocado por el péptido induce un aumento de la síntesis proteica y no un aumento del contenido de agua en su músculo

El secretagogo GHRP-6 también fue ensayado en camarones *Litopenaeus scmitti*, demostrándose que era capaz por si solo de estimular el crecimiento en crustáceos a partir de su aplicación por varias tres vías de administración: a) Inyección intramuscular; b) Oral; c) Inmersión (Ejemplo 4).

El secretagogo GHRP-6 fue ensayado en camarones *Litopenaeus schmitti*, demostrándose que era capaz de estimular el crecimiento en camarones a partir de su aplicación de 4 baños de inmersión, en diferentes estadios larvales. Al terminar el ciclo de cultivo de las larvas en un centro de desove, los grupos tratados con dosis similares a tilapia presentaban una mayor calidad. Esto estaba evidenciado en un incremento en peso, incremento en la talla, un mayor número de pares de ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales, un menor contenido de agua en el músculo de los animales y mayor concentración de ARN proteína en el músculo lo que evidenció una mayor actividad metabólica.

Las larvas tratadas con el péptido y el control fueron sembradas en estanques de tierra para ver su comportamiento productivo. El día de la cosecha de los estanques los animales tratados con el péptido mantuvieron el incremento del peso, de la talla y una mayor homogeneidad en el peso y la talla en este grupo al compararlos con el control.

(Ejemplo 5)

El secretagogo GHRP-6 fue ensayado en camarones *Litopenaeus schmitti*, demostrándose que es capaz de estimular el crecimiento en camarones mediante la inyección intramuscular, en camarones adultos. Al concluir los 15 días del experimento el péptido inyectado estimuló el crecimiento de los individuos entre un 100 - 150 % respecto al control. Con diferencias significativas ($p < 0.001$).

(Ejemplo 6 y 6.1)

El secretagogo GHRP-6 fue ensayado en camarones *Litopenaeus schmitti*, demostrándose que es capaz de estimular el crecimiento en camarones por vía oral, en larvas de camarón. El péptido GHRP-6 incluido en la dieta incrementó el crecimiento de los camarones entre un 30 - 40 % respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$). El secretagogo GHRP-6 bioencapsulado en *Artemia salina* incrementó el crecimiento de los individuos entre un 30 y un 40 % respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Demostración de la actividad biológica del GHRP-6 en peces.

Se determinaron los niveles de ARN mensajero del IGF-I en hígado de tilapias inyectadas intraperitonealmente con GHRP-6, así como se monitoreó los niveles de GH en los mismos animales en el tiempo, demostrándose que el GHRP-6 era capaz en peces de estimular la presencia de la GH circulante en sangre y como respuesta a esta de incrementar los niveles del ARN mensajero del IGF-I después de media hora de la inyección del péptido (Figura 1).

Quince tilapias de peso promedio $71 \pm 28\text{g}$ fueron utilizadas para el experimento. El péptido GHRP-6 fue inyectado a una concentración de $0.1 \mu\text{g/gbw}$ (microgramos de péptido por gramo de peso del animal). Las muestras de hígado y sangre se colectaron antes del tratamiento y 15, 30, 60 y 360 minutos después de la inyección del péptido (se utilizaron tres animales en cada tiempo). El suero y la sangre fueron congelados y guardados a -70°C hasta que se fueron utilizados para el ELISA para la cuantificación de la GH circulante o para la extracción del ARN mensajero en el caso del hígado para la cuantificación por Southern blot de los niveles de IGF-I.

El ARN total del hígado de las tilapias utilizadas en el experimento fue purificado según el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi. $20 \mu\text{g}$ de ARN total fueron aplicados y corridos en un gel de agarosa - formaldehído del 1%, finalmente fueron transferidos a una membrana de Nylon (Hybond N, Amersham UK) y hibridadas con una sonda marcada correspondiente al ADN complementario del IGF-I de tilapia (6) y seguidamente re-hibridado con una sonda del gen humano de la gliceraldehído 3 fosfato dehidrogenasa (GADPH, gentilmente donado por el Dr. Bryan Williams, Cleveland Foundation, OH, USA), para la normalización de las señales.

Las señales de la hibridación fueron cuantificadas a partir del procesamiento digital de la imagen de la radiografía, utilizando el "Hewlett Packard Scanjet Plus scanner". Las imágenes fueron procesadas con el programa de computación "Bandleader".

Los niveles de GH en el suero de las tilapias inyectadas fueron medidos por un ELISA, utilizando dos anticuerpos monoclonales contra la tiGH (Muñoz y cols, en preparación).

Ejemplo 2. Experimento de crecimiento en tilapias juveniles tratadas con GHRP-6

2.1 Aceleración del crecimiento en tilapias tratadas con GHRP-6 por vía intraperitoneal (ip)

El péptido GHRP-6 (BACHEM, Suiza) fue diluido en solución tampón de fosfato de sodio (PBS) e inyectado dos veces a la semana durante tres semanas a $0.1 \mu\text{g}$ de péptido/ g de peso húmedo de cada pez (gbw). El péptido fue aplicado a un grupo de 8 tilapias machos con peso promedio de $61.41 \pm 14.36\text{g}$ y se utilizó un grupo control de 7 tilapias machos con peso promedio de $61.58 \pm 29.67\text{g}$ el cual recibió PBS. Se midió el peso promedio cada semana (Figura 1). Todos los animales del experimento fueron marcados con microchips (Stoelting Co. Wood Dale, E.U.).

2.2 Aceleración del crecimiento en tilapias tratadas con GHRP-6 por vía oral

Para la administración por vía oral del péptido GHRP-6 se realizaron dos experimentos. El primero administrando el péptido en forma líquida disuelto en PBS y el segundo

administrando el péptido en forma de pequeñas perlas encapsulado en alginato de calcio según el protocolo previamente publicado por Knorr y colaboradores en 1988. (Figuras 2 y 3 respectivamente) En ambos experimentos se utilizaron grupos controles a los cuales se le administró solución salina y en todos los casos se utilizaron tilapias entubadas hasta la cavidad faríngea.

2.2.1 Péptido en solución acuosa

El péptido GHRP-6 (BACHEM, Suiza) fue diluido en PBS y administrado vía oral a través de un tubo plástico hasta la cavidad faríngea a un grupo de 7 tilapias machos que tenían un peso promedio de 84.66 ± 12.2 g. Se tomó un grupo control de 7 tilapias machos con peso promedio de 86.38 ± 6.26 g, al cual se le suministró PBS en las mismas condiciones que al grupo tratado con el péptido. El tratamiento se realizó dos veces por semana, durante tres semanas, administrándole una dosis de $0.1 \mu\text{g}$ de péptido/g de peso húmedo de cada pez (gbw) Se midió el peso promedio cada semana (Figura 2). Todos los animales del experimento fueron marcados con microchips (Stoelting Co. Wood Dale, E.U.).

2.2.2 Péptido encapsulado

Para la encapsulación del péptido se obtuvieron las cápsulas según lo reportado por Knorr y colaboradores en 1988. El hexapéptido encapsulado fue administrado a través de un tubo plástico a la cavidad faríngea a siete tilapias con un peso promedio de 89.09 ± 8.38 g. Perlas de polímero sin el péptido GHRP-6 fueron suministrados por la misma vía al grupo control consistente en siete tilapias machos de peso promedio de 89.86 ± 13.54 g. El tratamiento se realizó dos veces por semana durante tres semanas administrando en cada ocasión $0.1 \mu\text{g/gbw}$.

Ejemplo 3. Estimulación del crecimiento en tilapias (*Oreochromis sp*) mediante el péptido GHRP-6 vía inmersión

Se realizó la evaluación del crecimiento en tilapia *Oreochromis sp.* de 1.5g utilizando el péptido GHRP-6 en dosis de $10 \text{ mg}/100\text{ml}$ y de $100 \text{ mg}/100\text{ml}$, también se determinó el valor de hematocrito para tener una idea sobre el estado de la bioquímica sanguínea en los animales tratados con respecto a los controles.

En este mismo experimento se estudió la presencia de Trichodinicos y helmintos monogeneos en los animales utilizados en el ensayo, para observar y comparar la intensidad y la extensión de la invasión de estos agentes patógenos en los grupos tratados.

Por último se realizó un estudio de la concentración de proteína y del porciento de humedad en el músculo de las tilapias estudiadas.

Tres grupos con tres réplicas de 15 animales de un mismo desove, con un promedio de peso inicial de 1g fueron escogidos para el ensayo, para lo cual se utilizaron 9 tanques de 40L. Todos los animales se trataron con el péptido vía inmersión una vez por semana durante 15 minutos por 45 días y el grupo control recibió la misma manipulación y la inmersión se les realizó en solución salina.

Los grupos y tratamientos se distribuyeron de la siguiente forma:

Grupo 1 10 µg/100ml (Tratamiento 1)

Grupo 2 100 µg /100ml (Tratamiento 2)

Grupo 3 Control negativo (Solución salina)

Tabla 1. Estudio del peso. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamientos	n	Media del peso (g) ± DS	Comparación entre grupos	Diferencia
Grupo I 10 µg/100 mL	25	4.56±1.07	I-II	0.01454
Grupo II 100µg /100 mL	25	4.54±1.38	II-III	1.07177*
Grupo III Solución salina	25	3.47±1.52	III-I	1.08632*

**Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras*

Tabla 2. Estudio de los valores del Hematocrito. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamientos	n	Media del hematocrito ± DS	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 µg /100 mL	15	27.46±4.53	I-II	(2.4)*
Grupo II 100µg /100 mL	15	25.06±5.25	II-III	(1.0)*
Grupo III Solución salina	15	26.46±4.08	III-I	(1.4)*

**No hay diferencias significativas entre los grupos. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras*

Tabla 3. Resultados de la intensidad de la invasión (I) y la extensión de la invasión (E) en los organismos tratados, para el protozoo cutáneo *Trichodina* sp. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamiento	n	I ^a	E (%) ^b	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 µg /100 mL	25	7.73	100	I-II	(4.42)
Grupo II 100µg /100 mL	25	2.80	84.6	II-III	(5.84)*
Grupo III Solución salina	25	8.76	92.30	III-I	(1.42)

^aI: Intensidad de la invasión

^bE: Extensión de la invasión

**Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras*

Tabla 4. Resultados de la intensidad de la invasión (I) y la extensión de la invasión (E) en los organismos tratados según los valores del conteo de Helmintos monogeneos encontrados en las branquias de cada pez. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamiento	n	I ^a	E (%) ^b	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 µg /100 mL	25	0.39	34.7	I-II	(0.304)
Grupo II 100µg /100 mL	25	0.66	50	II-III	(0.521)
Grupo III Solución salina	25	1.07	46	III-I	(0.826)*

**Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras*

Tabla 5. Valores del porcentaje de humedad en el tejido muscular. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días.

Tratamiento	n	Media de la humedad ± DE (%)	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 µg /100 mL	24	82.96±3.63	I-II	(0.791)
Grupo II 100µg /100 mL	24	83.5±3.31	II-III	(2.666)*
Grupo III Solución salina	24	86.42±3.23	III-I	(3.458)

*Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras.
DE: desviación estándar.

Tabla 6. Valores de la concentración de proteínas en el tejido muscular. Experimento de inmersión con el péptido GHRP-6 en tilapias de 1g de peso en un período de 45 días

Tratamiento	n	Media de la concentración de proteínas \pm DE	Comparación entre grupos	Comparación estadística
Grupo I. 10 μ g /100 mL	23	6.10	I-II	(1.160)*
Grupo II 100 μ g /100 mL	23	4.94	II-III	(1.38)*
Grupo III Solución salina	23	3.55	III-I	(2.64)*

*Diferencia significativa estadísticamente. Se le aplicó el test de rangos múltiples a las muestras.
DE: desviación estándar.

Ejemplo 4. Experimento de crecimiento en camarones *Litopenaeus schmitti* por baños de inmersión con el péptido GHRP-6.

Se tomaron cuatro grupos de larvas camarones se les aplicaron cuatro baños de inmersión, uno cada tres días de una hora de duración con diferentes concentraciones del péptido GHRP-6 a tres de ellos y un grupo se tomo como control. Las concentraciones del péptido utilizadas fueron: 0.001, 0.01 y 0.1 mg/L, en los grupos I, II y III respectivamente, al grupo control se le dio la misma frecuencia de baños de inmersión con BSA a 1 mg/L.

Como resultado se observó que el grupo tratado con la mayor concentración de péptido 0.1 mg/L, se mejoraba la calidad de las larvas de los camarones *Litopenaeus schmitti*. Esto estaba evidenciado en un incremento en peso del 125-153 %, de un 15-26% de incremento en la talla, un mayor número de pares de ramificaciones branquiales y modificaciones rostrales para cada parámetro se realizó el test estadístico correspondiente encontrándose en todos los casos diferencias altamente significativas (Figura 5). Además se encontró que los animales tratados con GHRP-6 presentaban menor contenido de agua en el músculo y mayores valores de las relaciones RNA/DNA, Proteína/DNA, dando idea de lo activado del metabolismo del músculo de estas larvas (Figura 6 y 7).

Estos resultados son de gran importancia ya que al acelerar el crecimiento del camarón en los estadios iniciales de su vida, provoca una mayor sobrevida en la fase del cultivo lo que es vital para aumentar la productividad de este crustáceo de tanto valor comercial en el mundo.

La idea anterior fue corroborada en condiciones de producción en un aumento de la sobrevivencia del 20% en los animales tratados con GHRP-6 comparado con sus hermanos controles, además manteniéndose una estimulación del 115% en el peso y de un 37% en la talla, mostrando los animales tratados con el péptido mayor homogeneidad en la talla que sus hermanos no tratados reflejándose en que el coeficiente de variación de solo 24% y 9% en el peso y la talla respectivamente en animales tratados con el péptido a diferencia del 77% y 30% que se observa en el peso y la talla en los animales hermanos (Figura. 8).

Ejemplo 5 Estimulación del crecimiento en camarones mediante la Inyección intramuscular en animales de 15 g

Las inyecciones de 50 microL del péptido GHRP-6 fueron hechas entre el primer y segundo segmento abdominal usando una jeringuilla de insulina. Las inyecciones se realizaron 1 vez cada 3 días usando 1 microg/g de peso del péptido GHRP-6. El grupo control fue inyectado con 1 microg/g de peso de BSA. Se usaron 15 animales por cada grupo. El efecto del péptido GHRP-6 fue estimado midiendo la longitud del carapacho con un pie de rey y pesadas en una pesa de 0.1 g de error. Los animales se ubicaron en bolsas de nylon (0.8 cm de luz de malla) con dimensiones de 2 x 2 x 1 (largo x ancho x altura) en un estanque de tierra con una salinidad de 30 g·L⁻¹, 25 C y fotoperíodo natural. El efecto del péptido GHRP-6 fue estimado midiendo la longitud del carapacho de pie de rey y pesadas en una pesa de 0.1g de error.

La GHRP-6 inyectada a las diferentes concentraciones incrementó el crecimiento de los individuos entre un 100 - 150 % respecto al control. Con diferencias significativas ($p < 0.001$).

Ejemplo 6 Estimulación del crecimiento en camarones mediante la inclusión en la dieta

El péptido GHRP-6 fue incluido en una dieta para postlarvas de crustáceos al 1%. El péptido GHRP-6 incluido en la dieta fue microencapsulado por un método de coacervación compleja (Knorr D. and M.Daly. (1988). Process Biochemistry; 48-50). Posteriormente se alimentaron postlarvas de *Litopenaeus schmitti* con la dieta mencionada, así como un control con BSA incluido en el pienso. El efecto de tiGH fue estimado midiendo la longitud del carapacho de las larvas y postlarvas con un micrómetro óptico y pesadas en una pesa de 0.1 mg de error.

El péptido GHRP-6 incluido en la dieta incrementó el crecimiento de los camarones entre un 30 - 40 % respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

6.1. Encapsulación en artemia

El péptido GHRP-6 fue bioencapsulada en *Artemia* con las que fueron alimentadas las postlarvas de *Litopenaeus schmitti* y *Litopenaeus vanamei*. Para bioencapsular el péptido GHRP-6 en la *Artemia salina*, se le adicionó a una concentración de 10 mg/L durante 1 hora y se cosecharon y lavaron. Posteriormente se alimentaron las postlarvas de *Litopenaeus schmitti* con esta *Artemia* cuatro veces al día durante un mes de experimentación. El grupo control fue alimentado con *Artemia salina* con BSA bioencapsulada. El efecto del péptido GHRP-6 fue estimado midiendo la longitud del carapacho de las larvas y postlarvas con un micrometro óptico y pesadas en una pesa de 0.01 mg de error.

El péptido GHRP-6 bioencapsulado en *Artemia salina* incrementó el crecimiento de los individuos entre un 30 y un 40 % respecto al control. Con diferencias altamente significativas ($p < 0.001$).

Ejemplo 7. Experimento de crecimiento en larvas de salmones (salmon salar) por baños de inmersión con el péptido GHRP-6

Se tomaron tres grupos de larvas de salmones (salmón salar) y se les aplicaron seis baños de inmersión, uno cada tres días de una hora de duración con diferentes concentraciones del péptido GHRP-6 a dos de ellos y un grupo se tomo como control. Las concentraciones del péptido utilizadas fueron: 0.01 y 0.1 mg/L, en los grupos I y II respectivamente, al grupo control se le dio la misma frecuencia de baños de inmersión con BSA a 1 mg/L.

Como resultado se observó, que en el grupo tratado con la mayor concentración de péptido 0.1 mg/L, se incrementó en peso del 120-145 %, tomando como referencia 100% del grupo control y se observó un incremento de un 15-26% de incremento en la talla con respecto al grupo control. Por otra parte se encontró que los animales tratados con GHRP-6 presentaban menor contenido de agua en el músculo, incremento en los valores de las relaciones RNA/DNA, Proteína/DNA, dando idea de la activación del metabolismo en los músculo de estas larvas.

Estos resultados son de gran importancia ya que al acelerar el crecimiento de las larvas de salmones en los estadios larvales, provoca una mayor sobrevida en esta fase del cultivo lo que es vital para aumentar la productividad de esta especie tan importante en el comercio de peces en el mundo.

Ejemplo 8. Efectividad del péptido GHRP-6 sobre el ectoparásito "sea lice" *Caligus sp.* en truchas (*Oncorhynchus mykiss*).

Truchas tratadas en sus estadios larvales mediante baños de inmersión dados cada tres días, en un total de 6 baños, con el péptido GHRP-6 a concentraciones de 0.01 mg/L, 0.1

mg/L y un grupo control, fueron puestos en jaulas de ceiba en una región afectada por el ectoparásito *Caligus sp.* De cada jaula se muestrearon cinco veces 20 peces a intervalos de una semana. Ambos grupos tratados en sus estadios larvales con el péptigo GHRP-6 redujeron significativamente ($p < 0.05$) la carga de chalimus y *Caligus* (dos tipos importantes de "sea lice") adultos en relación con el grupo control, no existiendo diferencia entre los grupos tratados.

Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial, CIGB



REIVINDICACIONES

Método para la estimulación del crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos.

1. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos caracterizado porque se emplea el péptido GHRP-6 de secuencia: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂.
2. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido GHRP-6 es añadido en formulaciones de pienso para la alimentación de estas especies a una concentración entre 0.01 – 50 µg de péptido por gramo de peso húmedo del animal.
3. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido GHRP-6 es suministrado en inyecciones periódicas con intervalos entre 1 y 7 días, a una concentración entre 0.05 – 10 µg de péptido por gramo de peso húmedo del animal.
4. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea el péptido en baños de inmersión a concentraciones entre 10 – 500 µg de péptido por litro, con intervalos entre 1 y 7 días, en agua dulce o salada.
5. Un método para estimular el crecimiento y resistencia a enfermedades en organismos acuáticos según la reivindicación 1, caracterizado porque se emplea el péptido encapsulado por vía oral a una concentración entre 0.05 – 10 µg de péptido por gramo de peso húmedo del animal con intervalos entre 1 y 7 días.
6. Un método según las reivindicaciones de la 1 a la 5 caracterizado porque se emplea en la tilapia *Oreochromis sp.*
7. Un método según las reivindicaciones de la 1 a la 5 caracterizado porque se emplea en *Salmon sp.*
8. Un método según la reivindicación 8 caracterizado porque se emplea en camarones de las especies *Litopenaeus schmitti* y *Litopenaeus vanamei*
9. Un método según las reivindicaciones de la 1 a la 5 caracterizado porque se emplea en *Penaeus sp.*
10. Un método según las reivindicaciones de la 1 a la 9 caracterizado porque se emplea en el tratamiento preventivo y terapéutico de infecciones parasitarias y otras enfermedades.

11. Un método según la reivindicación 10 caracterizado porque se emplea en el tratamiento preventivo y terapéutico de infecciones parasitarias causadas por *Trichodina* sp. y Helmintos monogéneos.
12. Un método según la reivindicación 12 caracterizado porque se emplea en el tratamiento preventivo y terapéutico de infecciones parasitarias causadas por sealice.
13. Un método según la reivindicación 10 caracterizado porque se emplea en el tratamiento preventivo y terapéutico de infecciones parasitarias causadas por ectoparásitos.
14. Una formulación veterinaria para estimular el crecimiento y la resistencia a enfermedades en peces y crustáceos caracterizada porque comprende el péptido GHRP-6 de secuencia: His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys -NH₂.
15. Una formulación según la reivindicación 27 caracterizada porque puede emplearse en forma inyectable, oral o por inmersión.

Lic. Mariela Vázquez Castillo
Agente Oficial, CIGB



Figura 1

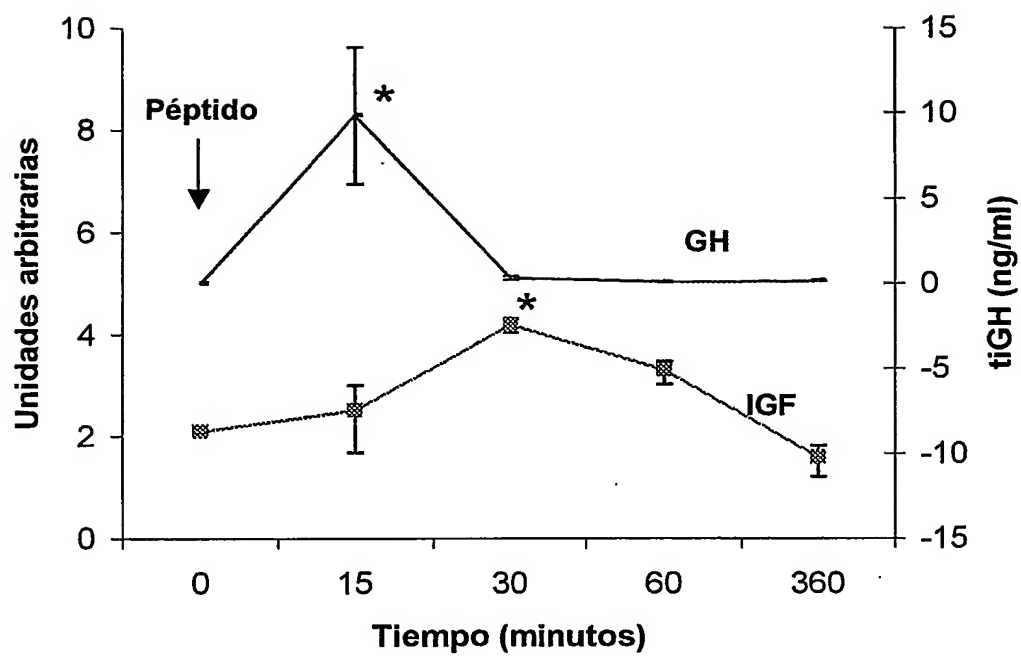


Figura 2

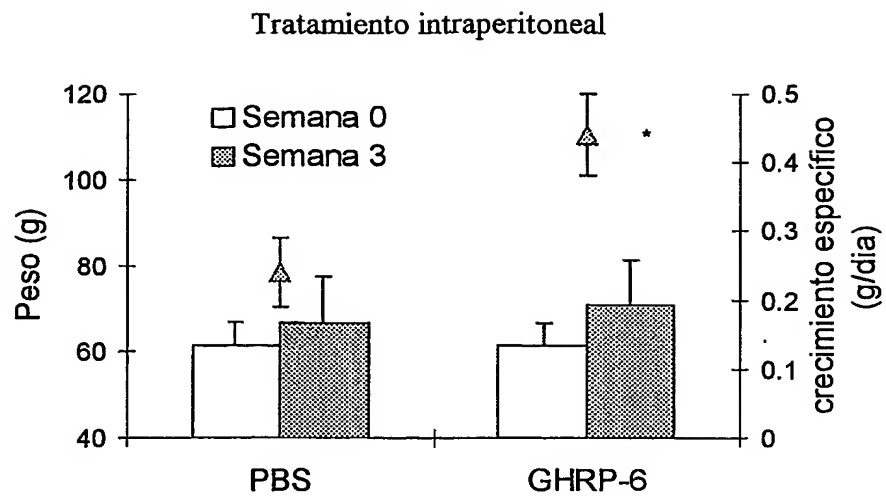


Figura 3

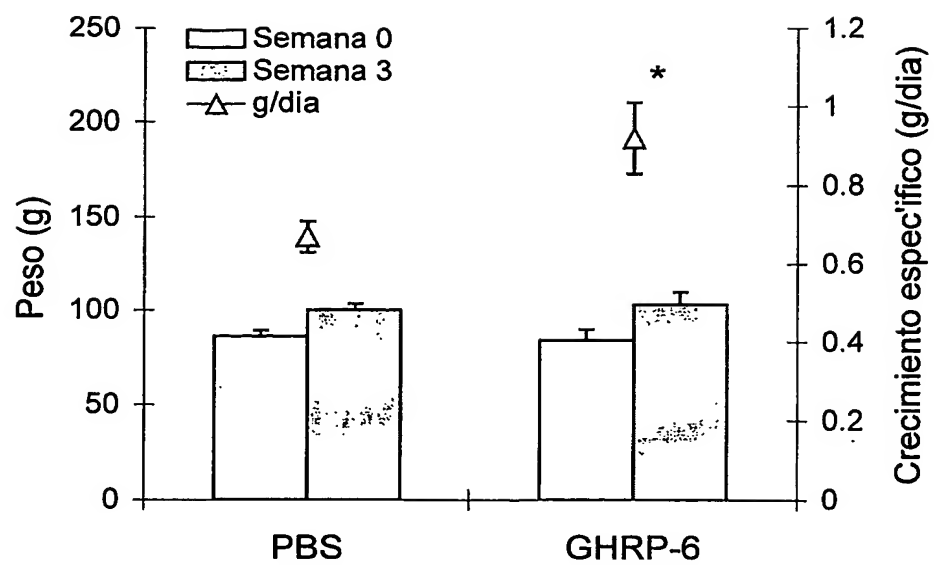


Figura 4

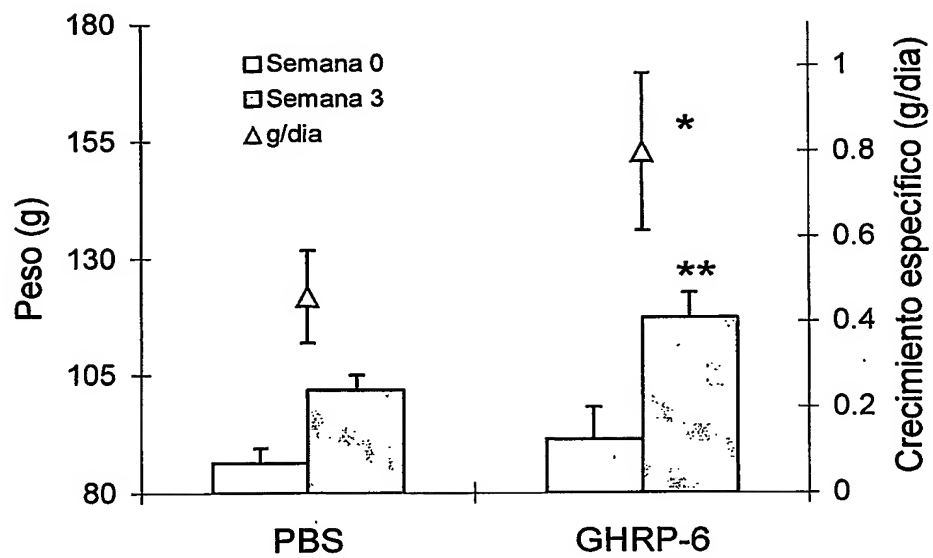


Figura 5

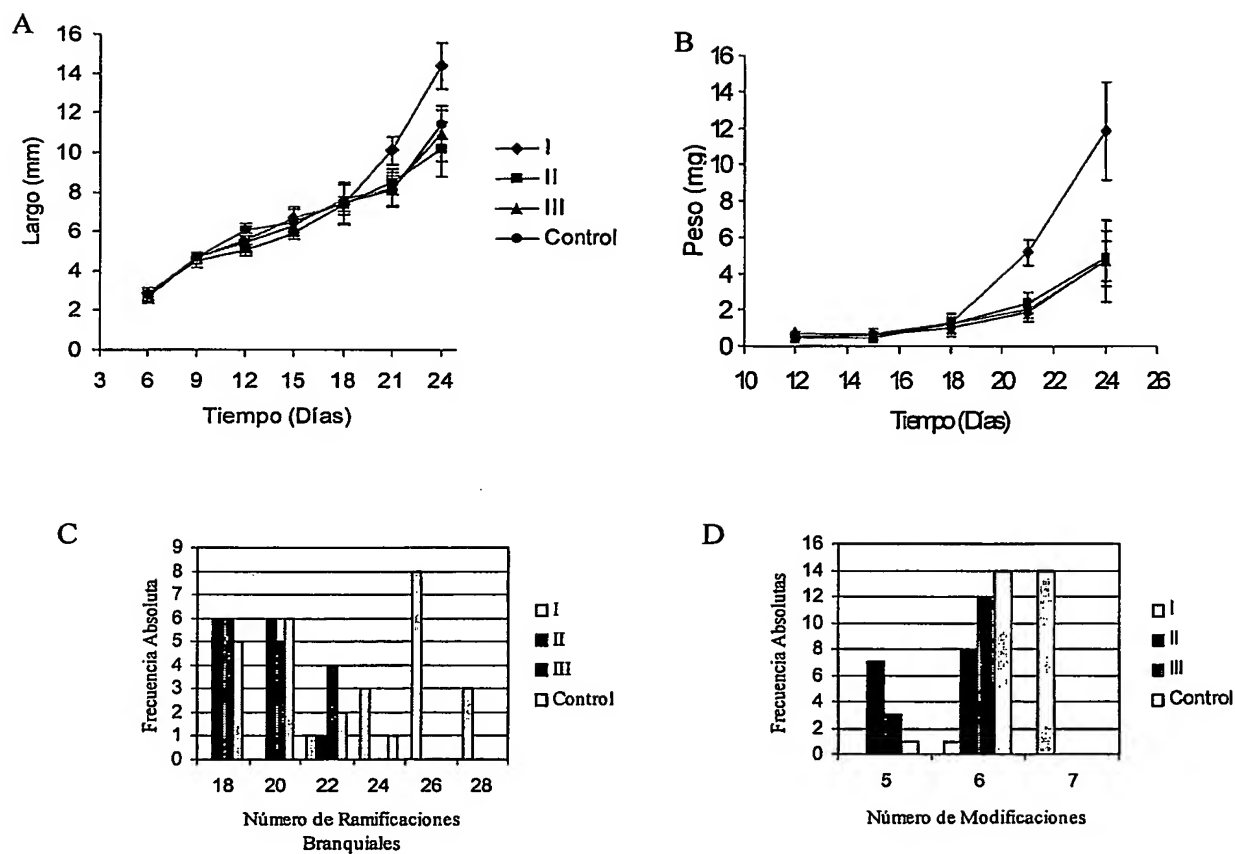


Figura 6

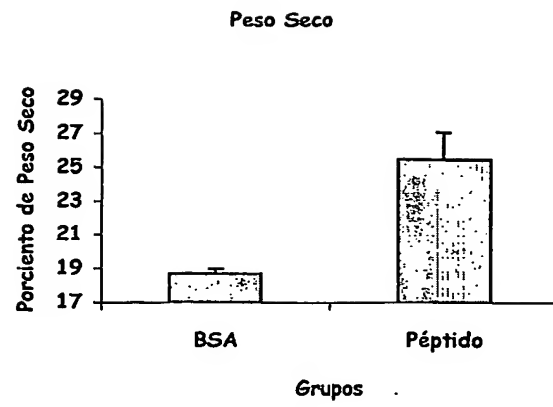


Figura 7

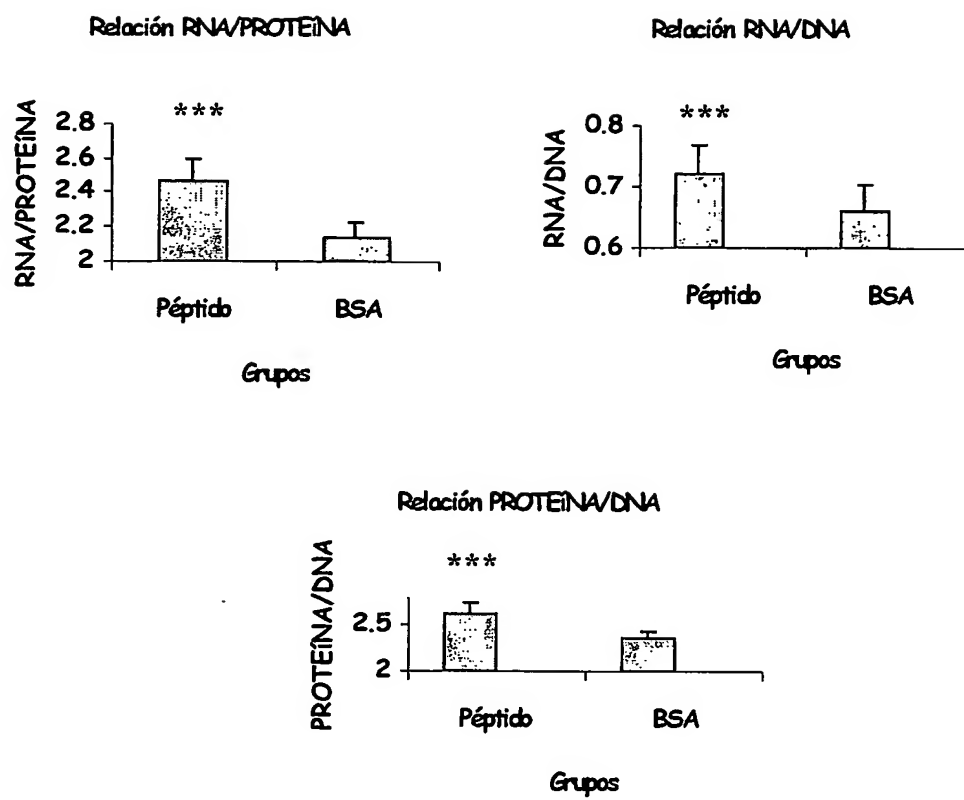
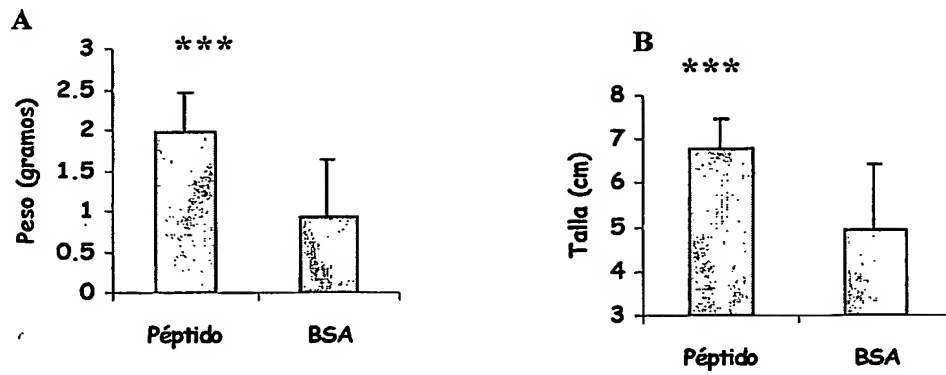


Figura 8



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**